252—257

8349(12)

动 物 学 研 究 1993, 14 (3): 252—257
Zoological Research

ISSN 0254-5853
CN 53-1040 / Q

牛 SRY 同源基因的 PCR 扩增和克隆*

周荣家** 张思仲 杨 军 唐永才
(华西医科大学医学遗传研究室 成都 610041)

Q959.842

摘要 本文采用人 SRY 基因的一对引物，通过 PCR 扩增获得了雄性牛（*Bos taurus*）SRY 同源基因片段，进一步证实牛存在与人 SRY 基因同源的相应基因。将 PCR 产物与载体 pUC-Eco-T 连接后，用以转化 JM109 菌，经过与人 SRY 基因探针菌落杂交，筛选获得了牛 SRY 同源基因克隆 pBosY O.6，后者的插人片段为相应于人 SRY 基因保守区在内的一段约 609 bp DNA。此外还比较分析了人和牛 SRY 同源基因片段限制酶图谱。

关键词: SRY，牛，性别决定 SRY基因

阐明人和哺乳动物性别决定机制不仅具有理论意义，而且在认识包括人类性分化异常等多种与性别有关的疾病，产前性别诊断和动物性别控制等方面都具有重要的实际意义。

近年来发现的 SRY 基因已经实验证实为人类男性睾丸决定因子基因（TDF）的最佳候选基因。但要充分认识这一基因结构、功能与进化，需要克隆一系列哺乳动物的 SRY 基因，并比较分析其同源性和变异性。牛是具有很高经济价值的动物。对该动物性别决定基因的研究除具有理论意义外，对其性别的人为控制和生育力的提高一直是人们长期希望能解决的课题。牛 SRY 基因的克隆有可能大大促进这些问题的解决。已经发现，以人 SRY 基因为探针与基因组 DNA 杂交，在雄性牛可见特异杂交带（Sinclair 等，1990）。这提示有可能利用人 SRY 基因探针克隆牛的相应基因。国内已简报克隆到牛 SRY 基因的一段 250 bp 的核心序列（曾溢滔等，1992）。与此同时，我们也克隆到牛 SRY 同源基因约 609 bp DNA 片段，它包括相应于已报告的人 SRY 的几乎整个开读框架。这无疑将有助于更充分地认识 SRY 基因和更准确的进行牛的性别鉴定。

材 料 与 方 法

一、材料 BS-SRY 探针为含人 SRY 保守区在内的 0.8 kb DNA 片段的重组质粒，由法国 Berta 博士惠赠。PCR 扩增用引物为参照已知的人 SRY 序列合成，其核苷酸序列为，引物 1: 5′ CCCGAATTCGACAATGCAATCATATGCTTCTGC3′，引物 2: 5′ CTGTAGCGGTCCCGTTGCTGCGGTG3′。用该引物可以扩增出正常

* 国家自然科学基金和 CMB 基金资助。 ** 现在武汉大学生命科学学院。
本文 1992 年 11 月 3 日收到，同年 12 月 24 日修回。

男性 SRY 基因保守区的 609 bp 的 DNA 片段（Berta 等，1990）。雄性牛基因组 DNA 来自肝脏组织，雌性牛则来自外周血白细胞。克隆载体为 pUC_{19}，宿主菌为 JM109。Taq DNA 聚合酶，限制酶，连接酶等试剂分别购自 PE 公司和华美生物工程公司，随机引物标记药盒购自 Promega 公司，〔α-^{32}p〕dCTP 购自福瑞生物工程公司。

二、方法 1. **肝组织和外周血白细胞 DNA 的制备** 按 Sambrook 等的方法进行。

2. **PCR 扩增** 在 25 μl 反应液中进行，反应液含适量模板约 50—400 ng，50 mmol／L KCl，1.5 mmol／L $MgCl_2$，10 mmol／L Tris.Cl pH8.0，0.01%明胶，200 μmol／L dNTP，两种引物各 0.4 μmol／L。在 PE-Cetus DNA 热循仪上进行，变性 7 min 后，加入 1 单位 Taq DNA 聚合酶，并以适量石蜡油覆盖。扩增人 DNA 的循环条件为 94℃ 30 s，65℃ 40 s，72℃ 1 min30 s；扩增牛 DNA 的循环条件为 94℃ 30 s，62℃ 40 s，72℃ 1 min30 s。循环次数为 42 次，最后一次延伸时间为 7 min。

3. **PCR 产物的高效液相色谱（HPLC）分析** 分析色谱柱为弱的阴离子交换柱 PE TSK DEAE-NPR。洗脱流动相 A 液含 1 mol／L NaCl，25 mmol／L Tris.Cl pH9.0；B 液含 25mmol／L Tris. Cl pH9.0。参照 Katz 等（1990）报道的洗脱条件进行洗脱。流速 1 ml／min，检测波长 260 nm。

4. **PCR 产物与载体的连接和转化** pUC_{19} 经 SmaI 酶切后，按 Marchuk 等（1991）的方法,向其 3′ 端加 dT。该反应共 20μl，内含 1μg pUC_{19}／Sma Ⅰ，1 单位 Taq DNA 聚合酶，50 mmol／L KCl，1.5 mmol／L $MgCl_2$，10 mmol／L Tris.Cl pH8.0，0.01%明胶，2 mmol／L dTTP。反应在 72℃ 进行 2 h，再用 EcoRⅠ酶切消化。最后用低熔点胶电泳分离主带，即为 pUC-Eco-T，溶于 H_2O 中备用。该载体与经 EcoRⅠ酶切的 PCR 产物约 609 bp 的 DNA 片段按等摩尔浓度进行连接。按 HanaHan（1983）的标准转化方法用连接物转化 JM109。

5. **菌落杂交** 按 Sambrook 等的常规方法进行。杂交在 65℃ 水浴中进行 15 h。杂交后的洗膜条件为 2× SSC／0.2%SDS，55℃；1× SSC／0.2%SDS，62℃；0.1× SSC／0.5%SDS，65℃。

6. **DNA 斑点杂交** 同菌落杂交条件。

结　　果

一、用人 SRY 引物 PCR 扩增牛同源的 SRY 基因 采用本文这对引物可特异地扩增出正常男性含 SRY 保守区的 609 bp DNA 片段，见图 1 E。采用同一对引物。在适宜条件下，也扩增出了雄性牛与人 SRY 同源的约 609 bpDNA 片段，而相应的雌性牛则不见此扩增带（图 1B，C，D）。

雄性牛 DNA 经 PCR 扩增产物，经 HPLC 分析，其结果见图 2。图中可见一个明显吸收峰。由于 HPLC 分析比凝胶电泳灵敏得多，图中还可见到几个非特异扩增带的吸收峰，但其峰相对较低。

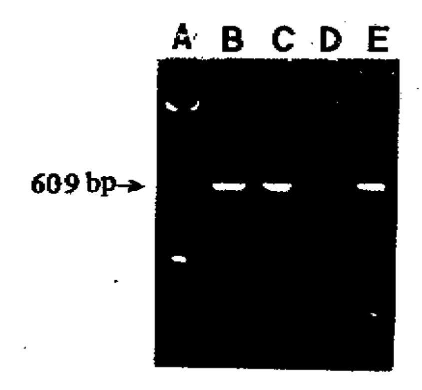


图1　用人SRY引物PCR扩增牛同源基因

Fig. 1　PCR amplification of cattle SRY with human SRY primers

A: 123 bp DNA片段大小标识;

B、C: 雄性牛，约609 bp扩增带;

D: 雌性牛; E: 男性，609 bp扩增带

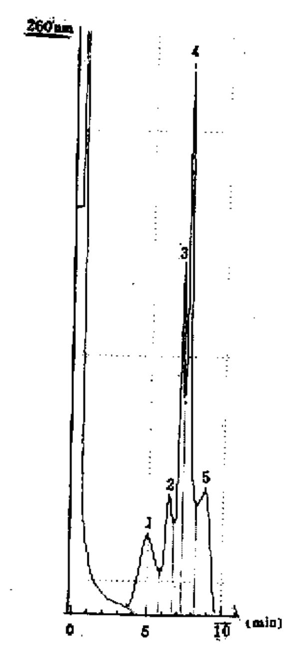


图2　雄性牛DNA PCR扩增产物的HPLC分析

Fig. 2　HPLC analysis of PCR products from cattle DNA amplification

第4吸收峰即对应于约609 bp DNA扩增带，其余几个峰为非特异扩增产物。洗脱程序为:

30%—40%A液，0.1 min (曲线);

40%—52%A液，2.9 min (线性)

52%—60%A液，7 min (线性);

60%—100%A液，0.5 min (线性);

100%A液，5 min (线性);

100%—30%A液，0.5 min (线性);

30%A液，7 min (线性)



图3　雄性牛DNA PCR产物约609 bp DNA片段与人SRY探针的斑点杂交

Fig. 3　Male cattle about 609 bp PCR product amplified with human SRY primers was hybridized with human SRY probe

A: BS-SRY，阳性对照

B: 雄性牛DNA PCR产物约609 bp DNA片段，其浓度分别为5 ng，1 ng，0.1 ng

回收约 609 bp DNA 的 PCR 产物与人 SRY 探针杂交结果见图 3。从图中可见牛 DNA PCR 产物能与人 SRY 探针杂交。表明扩增产物中的确含有与人 SRY 基因高度同源的序列，后者可能即是牛 SRY 同源基因。

二、牛 SRY 同源基因的克隆　1. 菌落杂交筛选牛与人 SRY 基因同源的阳性克隆　通过凝胶回收的牛 DNA PCR 产物约 609 bp 片段，经 EcoR Ⅰ 酶切后，与载体 pUC–Eco–T 连接，用以转化 JM109。转化菌用含 X–gal 之平板培养，从中挑出白色克隆点列于平板上培养过夜后，原位转印于 Hybond–N 膜上。用人 SRY 探针进行菌落杂交。结果获得了 3 个阳性克隆，见图 4。兹将其一命名为 pBosY0.6。



图 4　以人 SRY 探针菌落杂交筛选阳性克隆

Fig. 4　Identification of positive colony by colony hybridization with human SRY probe

2. pBosY0.6 的酶切和 PCR 扩增　用 EcoR Ⅰ，BamH Ⅰ，Xba Ⅰ，Pst Ⅰ 和 Taq Ⅰ 酶切 pBosY0.6，结果见图 5。以 pBosY0.6 DNA 为模板用人 SRY 引物进行 PCR 扩增结果见图 6。

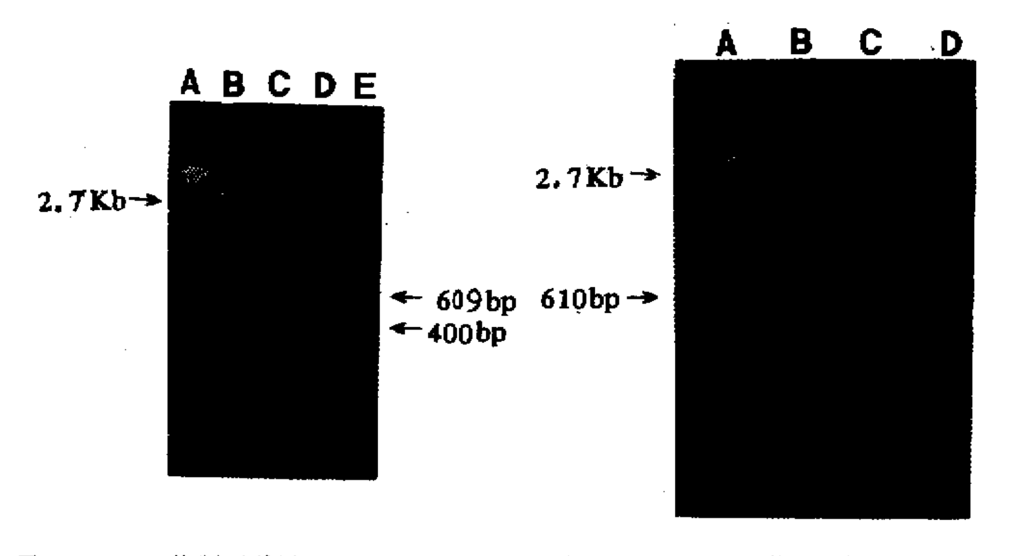


图 5　pBosY0.6 的酶切电泳图

Fig. 5　Electrophoretic map of pBosY0.6 cut by restriction enzymes

图 6　pBosY0.6 DNA 的 PCR 扩增

Fig. 6　PCR amplification of pBosY0.6 DNA

A: 123 bp DNA 片段大小标识;
B: EcoR Ⅰ和 BamH Ⅰ酶切 pBosY0.6,
可见约 609 bP 插入片段;
C: Xba Ⅰ酶切 pBosY0.6;
D: Pst Ⅰ酶切 pBosY0.6,
可见约 400 bp DNA 片段;
E: Taq Ⅰ酶切 pBosY0.6 之插入片段

A: 123 bp DNA 片段大小标识;
B: EcoR Ⅰ和 BamH Ⅰ酶切 pBosY0.6
C: Sma Ⅰ酶切 pUC_{19};
D: PCR 扩增 pBosY0.6,
可见约 609 bp 扩增带

讨 论

在人和哺乳动物中，Y染色体决定着个体向男（雄）性方向发育。而位于Y染色体上决定睾丸分化的睾丸决定因子基因（TDF）起着关键作用。人们曾相继发现蛇类中性别特异和高度保守的重复序列 BKm（Jones 等，1981）；男（雄）性特异的 H-Y 抗原（Wachtel 等，1975）；和 ZFY（Page 等，1987）等基因，但最終证实它们都不是真正的 TDF 基因。直到 1990 年由 Sinclair 等从人类Y染色体上克隆到单拷贝 SRY 基因，并经证实为 TDF 的最佳候选基因。除人类外，在许多哺乳动物中也发现了 SRY 的同源序列。表明 SRY 在哺乳动物中是高度保守的。本研究进一步表明，在雄性牛中存在与人 SRY 高度同源的基因。说明后者在该动物的性别决定机制中的作用极可能与人和其它哺乳动物类似。另一方面，在牛等哺乳动物中 SRY 的发现进一步证实了它在性别决定中的关键作用。

本文采用同源引物 PCR 扩增技术，用人 SRY 的一对引物扩增出了牛的同源基因片段，通过与载体 pUC-Eco-T 连接和转化及杂交筛选，进一步获得了牛 SRY 同源基因克隆。这些克隆的获得将有助于人和哺乳动物的性别决定机制和牛性别控制的深入研究。

本研究表明，牛 SRY 同源基因与人相应基因具有高度同源性。首先，引物区段具有很大同源性；其次，PCR 扩增人和牛 DNA 片段长度均为约 609bp，该开读框架长度是保守的；最后杂交结果也表明两者基因具有高度同源性。同时，存在于人 SRY 该开读框架内的内切酶切点与牛相应区段有一定差异。据文献报道，在小鼠和兔 Sry 相应区段的酶切点也有一定差异（Sinclair 等，1990；Gubby 等，1990）。这些差异也可能反映 SRY 基因在进化过程中的变异性。

参 考 文 献

曾溢滔. 1992. 应用聚合酶链反应（PCR）扩增牛Y染色体性别决定区（SRY）序列进行奶牛胚胎性别的鉴定. 科学通报，37（5）：479.

Berta P. *et al.* 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348: 448.

Gubbay J. *et al.* 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the nouse Y chromosome is a member of novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346: 245.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166: 557.

Jones K. W. *et al.* 1981. Conserved repeated DNA sequence in vertebrate sex chromosomes. *Human Genet.*, 58: 46.

Katz E. D. and Dong M. W. 1990. Ripid analysis and purification of polymerase chain reaction products by High-Performance liquid chromatography. *BioTechniques*, 8 (5): 546.

Marchuk D. *et al.* 1991. Construction of T-vector, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acid Res.*, 19 (5): 1154.

Page D. C. *et al.* 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, 51: 1091.

SambrooK J. 1989. Identification of bacterial colonies that contain recombinant plasmids, Mol. Cloning: A laboratory manual. *Cold spring Harbor Laboratory press*, 1: 85.

Sinclair A. H. *et al.* 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA- binding motif. *Nature*, 346: 240.

Wachtel S. S. *et al.* 1975. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*, 257: 235.

PCR AMPLIFICATION AND CLONING OF A GENE OF CATTLE (*Bos taurus*) HOMOLOGOUS TO HUMAN SRY

Zhou Rongjia Zhang Sizhong Yang Jun Tang Yongcai

(*West China University of Medical Sciences, Chengdu* 610041)

Using human SRY gene primers, the gene fragment of cattle homologous to human SRY was amplified by PCR. In male cattle, a gene fragment of about 609 bp homologous to human SRY was identified. By ligating pUC-Eco-T with the PCR products and colonies hybridization with human SRY probe, the positive colony with cattle the fragment was identified, and termed pBosY0.6. The colony contains a about 609 bp insert corresponding to human SRY conserved ORF. The restriction map of the recombinant was analysed and compared with that of human SRY gene.

Key words: SRY, Cattle, Sex determination